

Express Mail Label No.

Dated:



Docket No.: 04266/100M192-US4
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:
Amedeo LEONARDI, et al.

Application No.: 10/688,061

Confirmation No.: TBA

Filed: October 16, 2003

Art Unit: TBA

For: **LISINOPRIL/LERCANIDIPINE
COMBINATION THERAPY**

Examiner: TBA

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Italy	MI2002A 002594	December 6, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith.

December 23, 2003

Respectfully submitted,

Mitchell Bernstein, Ph.D.
Reg. No. 46,550
Agent for Applicants

DARBY & DARBY P.C.
Post Office Box 5257
New York, NY 10150-5257
212-527-7700



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N. **MI2002 A 002594**

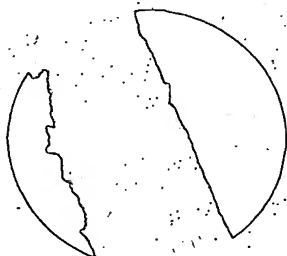
*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*



18 NOV. 2003

Roma, li

IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
.....
Dr.ssa Paola Giuliano



AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **RECORDATI INDUSTRIA CHIMICA E FARMACEUTICA S.p.A.**
 Residenza **MILANO** codice **00748210150**

2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Dr. Diego Pallini ed altri** cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza **NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.**
 via **C.so di Porta Vittoria** n. **9** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) **A61K** gruppo/sottogruppo **31 / 44**

Combinazione terapeutica per la cura dell'ipertensione

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ____/____/____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) **SARTANI Abraham** 3) **SIRONI Giorgio**
 2) **LEONARDI Amedeo** 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione tipo di priorità numero di domanda data di deposito allegato S/R

1) **nessuna** _____
 2) _____

SCIoglimento RISERVE
 Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **44** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) _____
 Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **02** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) _____
 Doc. 3) **0** **RIS** lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale _____
 Doc. 4) **0** **RIS** designazione inventore _____
 Doc. 5) **0** **RIS** documenti di priorità con traduzione in italiano _____
 Doc. 6) **0** **RIS** autorizzazione o atto di cessione _____
 Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente _____

8) attestati di versamento, totale Euro **DUECENTONOVANTUNO/80.-**

COMPILATO IL **06/12/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) **Diego Pallini**

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO MILANO**

codice **151**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA **MI2002A 002594** Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE** del mese di **DICEMBRE**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto per invenzione industriale, depositando _____ fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE **IL RAPPRESENTANTE È INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N.423 DEL 01/03/2001 EFFETTUA IL DEPOSITO CON RISERVA DI LETTERA D'INCARICO.**

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

M. GORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA **MI2002A 002594**

REG. A

DATA DI DEPOSITO **06/12/2002**

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

D. TITOLO

COMBINAZIONE TERAPEUTICA PER LA CURA DELL'IPERTENSIONE

L. RIASSUNTO

Vengono descritte composizioni farmaceutiche per il trattamento dell'ipertensione comprendenti lisinopril e lercanidipina in combinazione idonea a ridurre la pressione sanguigna, mantenendo gli effetti collaterali a livelli minimi.

M. DISEGNO



3848PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

Combinazione terapeutica per la cura dell'ipertensione

a nome di: RECORDATI INDUSTRIA CHIMICA E
FARMACEUTICA S.p.A.

6 DIC. 2002

con sede in: MILANO

MI 2002A 0 02594

Inventori designati: SARTANI Abraham, LEONARDI Amedeo, SIRONI

Giorgio

*** **

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda l'associazione terapeutica di lisinopril e lercanidipina per il trattamento dell'ipertensione arteriosa.

STATO DELLA TECNICA.

L'ipertensione è una delle malattie cardiovascolari più comuni. Negli Stati Uniti, l'ipertensione (che è definita come pressione sanguigna maggiore o uguale a 140/90 mm Hg) è stata diagnosticata ad oltre 50 milioni persone. L'elevata pressione arteriosa può causare cambiamenti patologici nei vasi sanguigni e ipertrofia del ventricolo sinistro. Per effetto del danno che può essere provocato dall'ipertensione, si ritiene che sia la causa principale di ictus, infarto miocardico ed arresto cardiaco improvviso. Inoltre si ritiene che sia la maggiore responsabile dell'insufficienza cardiaca, dell'insufficienza renale e dell'aneurisma dissecante dell'aorta.

Il sistema renina-angiotensina è un regolatore importante della pressione arteriosa. Il peptide angiotensinogeno inattivo viene convertito nel pro-peptide angiotensina I dall'enzima renina. L'angiotensina I viene quindi



[Handwritten signature]

convertita nella forma attiva, angiotensina II, mediante l'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE). L'angiotensina II agisce quindi attraverso una varietà di meccanismi mediati da ricettori, come l'aumento delle resistenze periferiche totali e l'inibizione dell'escrezione di sodio ed acqua dai reni, aumentando la pressione arteriosa

Gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) sono molecole che impediscono la conversione dell'angiotensina I nell'angiotensina II. L'azione ipotensiva di queste molecole è ben documentata ed essi sono state largamente usate nel trattamento dell'ipertensione. Esempi di ACE inibitori sono descritti nei brevetti USA n°4.350.633, 4.344.949, 4.294.832, 4.350.704.

Il lisinopril (S)-1- [N²-(1-(carbossi-3-fenilpropil)-L-lisil)-L- prolina] è un ACE inibitore descritto nel brevetto USA n°4.555.502. A seguito di somministrazione orale, le concentrazioni del picco ematico di lisinopril si verificano entro circa 7 ore, sebbene vi sia una tendenza a ritardare tali concentrazioni del picco ematico nei pazienti colpiti da infarto miocardico acuto.

Il Lisinopril non è soggetto al metabolismo e viene eliminato invariato nell'urina.

L'azione anti-ipertensiva di tale farmaco è ritenuta risultare principalmente dalla soppressione del sistema renina-angiotensina quale risultato della inibizione della formazione di angiotensina II. La dose iniziale raccomandata di Lisinopril come monoterapia per l'ipertensione essenziale è di 10 mg una volta al giorno con una titolazione di 20-40 mg al giorno. Dosaggi fino a 80 mg/giorno sono stati usati ma non

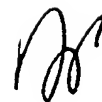


sembra diano un migliore effetto. Il dosaggio più comune è di 20-40 mg al giorno. Molte settimane di terapia possono essere necessarie per ottenere la riduzione ottimale della pressione sanguigna del paziente. Per pazienti con deterioramento della funzione renale la dose iniziale raccomandata è di 2,5 mg. Il dosaggio può essere aumentato fino a quando la pressione sanguigna è controllata oppure fino a un massimo di 40 mg/giorno. Il Lisinopril è disponibile in commercio da fornitori di farmaci (ad esempio Astra Zeneca venduto con il nome commerciale Zestril ® e Merck venduto col nome commerciale di Prinvil ®) ed è stato approvato per il trattamento dell'ipertensione in molti paesi. Il Lisinopril ha molti effetti collaterali comprendenti: mal di testa, vertigini, affaticamento, tosse, disturbi gastrointestinali, infezioni delle vie respiratorie superiori, diarrea, crampi muscolari, esantema e impotenza.

Un' altra classe di agenti attivi usati per il trattamento dell'ipertensione è quella dei calcio antagonisti. Questi agenti attivi inibiscono l'ingresso degli ioni calcio nelle cellule, specialmente nelle cellule della muscolatura liscia.

L'inibizione dell'ingresso del calcio produce un rilassamento della muscolatura liscia, come quella attorno alle arterie e alle vene, il quale porta ad una diminuzione della ipertensione osservata. Tali agenti attivi come pure la loro attività ipotensiva sono descritti in numerose pubblicazioni e domande di brevetto.

La lercanidipina (metil 1,1,N-trimetil-N-(3,3-difenilpropil)-2-amminoetil-1,4-diidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)piridina 3,5-dicarbossilato) è un calcio antagonista diidropiridinico altamente lipofilo avente una azione



prolungata e una selettività vascolare elevata. Il meccanismo della sua attività anti-ipertensiva è dovuto a un effetto rilassante diretto sulla muscolatura liscia dei vasi sanguigni, riducendo in tal modo la resistenza totale periferica. La dose iniziale raccomandata per la lercanidipina nella monoterapia è di 10 mg/giorno per via orale con titolazione di 20 mg/giorno. La lercanidipina viene rapidamente assorbita a seguito della somministrazione orale e il picco plasmatico si verifica 2-3 ore dopo la somministrazione.

L'eliminazione avviene essenzialmente per via epatica. In virtù della sua elevata lipofilicità e l'elevato coefficiente di membrana la lercanidipina combina una breve emivita nel plasma con una lunga durata d'azione. Infatti la distribuzione preferenziale del farmaco nelle membrane delle cellule della muscolatura liscia, dà luogo a una farmacocinetica controllata dalla membrana che è caratterizzata da un prolungato effetto farmacologico. In confronto ad altri calcio antagonisti la lercanidipina è caratterizzata da una graduale insorgenza e da una lunga durata d'azione malgrado la diminuzione del livello plasmatico. Studi "in vitro" mostrano che la risposta dell'aorta di ratto isolata verso un elevato valore di K^+ può essere attenuata dalla lercanidipina fino a 6 ore dopo che il farmaco è stato eliminato dal tessuto.

La lercanidipina è disponibile in commercio da Recordati SpA (Milano, Italia) ed è stata descritta insieme ai metodi per la sua preparazione e risoluzione nei suoi singoli enantiomeri nei brevetti USA 4.705.797, 5.767.136, 4.968.832 e 5.696.139.

Studi clinici hanno mostrato che la lercanidipina alla dose di 10 mg/giorno



(titolati a 20 mg/giorno in pazienti non rispondenti o rispondenti in maniera inadeguata alla dose di 10 mg) fornisce un'azione farmacologica prolungata e un effetto antiipertensivo significativo.

Nei pazienti ipertesi l'insorgenza d'azione della lercanidipina è graduale e il farmaco ha un effetto di diminuzione della pressione sanguigna significativo durante l'intervallo della somministrazione del farmaco. Il graduale e regolare effetto antiipertensivo è stato recentemente confermato anche con l'uso del "Smoothness Index" come descritto da Omboni e Zanchetti in Hypertension 1998,16: 1831-8. L'analisi di una larga popolazione di pazienti ipertesi ha documentato che la lercanidipina è un farmaco molto ben tollerato, privo di effetti collaterali rilevanti. Nel corso di questa esperienza sul mercato non sono emersi segnali preoccupanti circa la sicurezza o le possibili interazioni con altri farmaci confermando che l'uso in pazienti ipertesi può essere considerato sicuro. La lercanidipina è controindicata (come tutte le diidropiridine) in pazienti con angina instabile o infarto miocardico recente (da meno di un mese).

Esistono molteplici razionali farmacologici che descrivono le combinazioni di un inibitore ACE con un calcio antagonista per il trattamento dell'ipertensione. Ad esempio il fatto che sistemi fisiologici multipli partecipano al controllo della pressione sanguigna è stato indicato quale motivo della diminuzione dell'efficacia nel tempo dei singoli agenti attivi. L'intervento farmacologico su uno di questi sistemi è ritenuto far innescare un meccanismo di contro-regolazione. Una combinazione di trattamenti aumenta il numero dei meccanismi



potenzialmente capaci di ridurre una elevata pressione sanguigna e riduce la velocità e l'entità degli eventi avversi prodotti da ogni principio attivo. Inoltre l'aggiunta di un agente può contrastare taluni effetti negativi prodotti dagli altri farmaci. Per questo una combinazione a basso dosaggio di due differenti agenti riduce il rischio di reazioni negative correlate alla dose pur consentendo una riduzione sufficiente della pressione sanguigna. Associazioni ottimali sono quelle tra un diuretico tiazidico e un ACE inibitore oppure un calcio antagonista e un ACE inibitore. Associazioni tra un calcio antagonista e un diuretico o tra un ACE inibitore e un beta-bloccante possono pure essere usate ma una parziale sovrapposizione del loro meccanismo di azione può rendere la loro efficacia inferiore a quella della somma dei singoli agenti (Mancia e Grassi, High Blood Pressure 1994, 3 (Supp, 4) 5-7).

Gli ACE inibitori attenuano la vasocostrizione attraverso la riduzione dell'effetto vasocostrittore dell'angiotensina II e l'aumento delle chinine vasodilatatrici, mentre i calcio antagonisti agiscono attenuando il flusso transmembrana del calcio e inibendo l'accoppiamento elettromeccanico mediato dal calcio in tessuti contrattili in risposta a numerosi stimoli. Inoltre entrambe le classi di farmaci facilitano la secrezione di sale e di acqua da parte del rene mediante differenti meccanismi. Gli ACE inibitori ripristinano la risposta renale-surrenale al carico salino mentre il calcio antagonista possiede intrinseche proprietà di natriuresi, probabilmente attraverso meccanismo di inibizione del riassorbimento di acqua e sale da parte dei tubuli (Weir, AJH 1998, 11.163S-169S).

Gli inibitori ACE inoltre possono ridurre gli effetti controregolatori indotti



dai calcio antagonisti (e cioè la stimolazione del sistema simpatico) e d'altra parte il bilancio negativo del sodio indotto dai calcio antagonisti potrebbe potenziare gli effetti ipotensivi degli inibitori ACE (Menard e Bellet J. Cardiovas. Pharmacol. 1993;21 Suppl.2:S49-S54).

Oltre ai vantaggi farmacologici si richiede alla terapia di combinazione di soddisfare le direttive attuali che prevedono un trattamento più aggressivo della pressione sanguigna. Ad esempio recenti World Health Guidelines raccomandano una pressione diastolica del sangue inferiore a 85 mm Hg e una pressione sistolica del sangue inferiore a 130 mm Hg in pazienti giovani e in diabetici.

Attualmente vi sono varie combinazioni prestabilite di inibitori ACE e di calcio antagonisti che sono sul mercato in Europa e negli Stati Uniti. E queste comprendono combinazioni di ramipril e felodipina, trandolapril e verapamil, enalapril e felodipina, benazipil e amlodipina, enalapril con diltiazem. Molti pazienti possono rilevare effetti collaterali dovuti ad uno o entrambi gli agenti attivi somministrati oppure dovuti alla specifica combinazione dei due agenti attivi.

Tuttavia combinazioni prestabilite offrono la possibilità di somministrare una combinazione di agenti attivi in una singola forma di dosaggio. Tale forma probabilmente aumenterà l'adesione del paziente. Quindi tale forma di somministrazione probabilmente migliorerà l'adesione del paziente al programma terapeutico e aumenterà il successo di un tale trattamento.

Inoltre un certo numero di pazienti sono non rispondenti a una o più delle mono terapie disponibili, e altri pazienti non rispondono alle



combinazioni terapeutiche suddette. Non vi è al presente nessun modo per prevedere se questi pazienti saranno rispondenti a una terapia basata su una nuova combinazione di principi attivi. E' stato calcolato che in generale da 30-50% dei pazienti non rispondono a una mono terapia (questa media non comprende i dati relativi ai pazienti che assumono la lercanidipina).

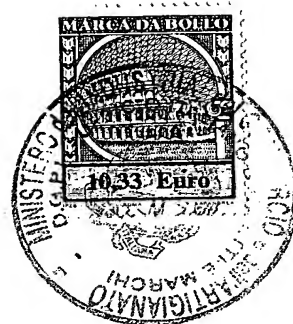
Singole unità posologiche di lisinopril e di diuretico di tiazide cloridrato sono approvate per il trattamento dell'ipertensione e sono messe sul commercio da parte della Astra Zeneca (Zestoretic e Merck (Prinzide). Le unità posologiche disponibili comprendono 10 mg lisinopril e 12,5 mg tiazide cloridrato, 20 mg di lisinopril e 12,5 mg tiazide cloridrato, 20mg di lisinopril e 25 mg di tiazil cloridrato.

Di conseguenza le unità posologiche disponibili comprendono quantitativi di lisinopril che sono sufficienti per la mono terapia con una sola dose giornaliera.

Per quanto detto, vi è una continua richiesta per trattamenti anti-ipertensivi efficaci basati su combinazione aventi una lunga durata del meccanismo selettivo di azione con pochi effetti collaterali.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE.

La presente invenzione riguarda metodi per il trattamento dell'ipertensione per quattro classi di pazienti. La prima categoria di pazienti riguarda quelli rispondenti alla monoterapia sia con lisinopril sia con lercanidipina, ma che soffrono di effetti collaterali e per i quali sarebbe desiderabile diminuire il dosaggio di principio attivo usato nella mono terapia.



In altre parole questi agenti attivi esplicano una attività anti-ipertensiva e diminuiscono la pressione sanguigna del paziente secondo una progressione prestabilita. Una combinazione di lisinopril e lercanidipina risulta particolarmente indicata per tali pazienti.

Pertanto un aspetto la presente invenzione si riferisce ad un metodo per il trattamento anti-ipertensivo dei pazienti, il metodo consiste nella somministrazione di un primo quantitativo di lercanidipina e di un secondo quantitativo di lisinopril, dove i quantitativi in combinazione tra di loro sono efficaci per ridurre la pressione sanguigna di almeno un valore prestabilito e così ripristinare la pressione sanguigna entro limiti accettabili e dove almeno uno del primo o del secondo quantitativo è inefficace per produrre una riduzione della pressione sanguigna del paziente oppure la riduzione di pressione è inferiore al valore prestabilito. In altre parole i quantitativi dei due agenti impiegati nella combinazione risulterebbero ciascuno inferiore al valore ottimale o al valore limite (e cioè producono una diminuzione della pressione sanguigna inferiore a quella prestabilita o sono del tutto inefficaci se somministrati in mono terapia). In una realizzazione preferita sia il quantitativo del primo e del secondo agente sono tali da risultare inefficaci a produrre nel paziente una riduzione della pressione sanguigna oppure la riduzione è inferiore al valore prestabilito.

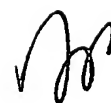
La seconda categoria dei pazienti è costituita da pazienti "non rispondenti" alla monoterapia.

In questi pazienti l'agente attivo da solo non produce attività anti-ipertensiva.



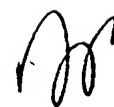
In un altro aspetto la presente invenzione riguarda un metodo per il trattamento dell'ipertensione in pazienti "non rispondenti" comprendente la somministrazione di un primo quantitativo di lercanidipina e un secondo quantitativo di lisinopril, dove i quantitativi in combinazione tra loro sono efficaci per ridurre la pressione sanguigna del paziente almeno del valore predeterminato e ripristinano così la pressione entro limiti accettabili. Normalmente si sarà predeterminato in via preliminare che il paziente non risponde o risponde in modo insufficiente alla monoterapia sia con la lercanidipina sia con il lisinopril o anche con un qualsiasi altro agente antiipertensivo singolo. Questa realizzazione è particolarmente desiderabile per quei pazienti che sono resistenti alla monoterapia con lercanidipina. La lercanidipina generalmente funziona molto bene, per tanto i pazienti che sono resistenti alla monoterapia con lercanidipina possono essere difficili da curare.

La terza categoria di pazienti riguarda quelli parzialmente rispondenti alla monoterapia o alla terapia di combinazione. La monoterapia o la terapia di combinazione produce un effetto antiipertensivo in questi pazienti, ma la terapia non diminuisce la pressione sanguigna secondo il programma prestabilito. Dosi maggiori non producono l'effetto desiderato di diminuzione della pressione di un predeterminato valore e possono produrre effetti indesiderati. Sotto un altro aspetto la presente invenzione comprende un metodo per il trattamento dell'ipertensione in un paziente "rispondente in maniera parziale", detto metodo comprendendo la somministrazione al paziente di un primo quantitativo di lercanidipina e di un secondo quantitativo di lisinopril, dove i quantitativi di combinazione



tra loro sono efficaci per ridurre la pressione del paziente di almeno un valore prestabilito, mentre la somministrazione del primo quantitativo e del secondo quantitativo da soli, non è efficace per ridurre la pressione al valore prestabilito.

La quarta classe di pazienti comprende quelli che sono rispondenti alla monoterapia ma per i quali in precedenza è stato accertato (o si presume), che possano diventare col tempo non rispondenti. Convenzionalmente i pazienti di questa classe, nel momento in cui diventano non rispondenti, richiedono una monoterapia che possa comportare un maggior dosaggio del medesimo agente attivo oppure di un diverso agente attivo per il trattamento dell'ipertensione (cioè la riduzione della pressione sanguigna ad un valore prestabilito). Tuttavia bisogna tener presente che questi pazienti possono anche non rispondere ad un aumento del dosaggio avendo già raggiunto la massima efficacia del prodotto. La causa di questo cambiamento della risposta del paziente può anche essere un meccanismo di compensazione (di controregolazione) oppure anche una diversa causa. In un altro ulteriore aspetto la presente invenzione comprende un metodo per il trattamento dell'ipertensione in un paziente della quarta categoria, per il quale era stato precedentemente riconosciuto essere rispondente alla monoterapia con lercanidipina o con lisinopril, il metodo comprendendo la somministrazione al paziente di una composizione consistente in un primo "quantitativo terapeutico" di lercanidipina e di un secondo "quantitativo terapeutico" di lisinopril nella quale combinazione i quantitativi dei principi attivi sono efficaci per ridurre la pressione



sanguigna nel paziente di almeno un valore prestabilito, ripristinando la pressione in limiti accettabili. In una realizzazione preferita i quantitativi di lisinopril e lercanidipina sono a valori sub-limali per ogni agente, tali che non sarebbero efficaci nella monoterapia.

Infine, in via di principio, la presente invenzione può essere impiegata con pazienti inconsapevoli sebbene le norme stabilite dalle autorità competenti non incoraggino questa pratica.

In un ulteriore aspetto la presente invenzione comprende metodi di trattamento di un paziente di una qualsiasi delle classi suddette, il quale paziente è diabetico (ad esempio un diabetico del tipo II) sebbene preferibilmente il paziente delle suddette classi non è diabetico (ad esempio è un non diabetico del tipo II).

La presente invenzione riguarda pure le composizioni e le forme farmaceutiche di dosaggio.

Le composizioni e i metodi qui descritti hanno il potenziale vantaggio di consentire trattamenti con almeno un agente attivo in quantità sub-liminare, consentendo una maggiore tollerabilità da parte dei pazienti sensibili all'agente attivo consentendo il suo sinergismo e cioè la superadditività tra gli agenti attivi, consentendo efficacia elevata a lungo termine e un elevato dosaggio per tutto il periodo.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

In figura 1 si riporta una rappresentazione grafica dell'effetto sulla pressione diastolica in ratti anestetizzati uninefrectomizzati, trattati rispettivamente con: placebo, lercanidipina 10µg/kg, lisinopril (30µg/kg), lercanidipina (10µg/kg)+ lisinopril (30µg/kg), dove in ordinata si riporta la



pressione diastolica in mm Hg ed in ascissa si riporta il tempo in minuti.

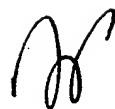
In figura 2 si riporta una rappresentazione grafica dell'effetto sulla pressione sistolica in ratti anestetizzati uninefrectomizzati, trattati rispettivamente con: placebo, lercanidipina 10µg/kg, lisinopril (30µg/kg), lercanidipina (10µg/kg)+ lisinopril (30µg/kg), dove in ordinata si riporta la pressione sistolica in mm Hg ed in ascissa si riporta il tempo in minuti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Per "lercanidipina " si intende nella presente descrizione la lercandipina come tale o un suo sale farmaceuticamente accettabile e preferibilmente la lercanidipina cloridrato.

Per "lisinopril" si intende nella presente descrizione il lisinopril in quanto tale oppure la forma diidrata che è la forma commercialmente disponibile.

Il termine "ipertensione" come qui usato, significa una pressione sanguigna arteriosa anormalmente elevata a confronto con quella di una precedente lettura e il valore elevato in misura anomala è mantenuto per un determinato periodo. Per convenzione il periodo di tempo è da 3-6 mesi. L'aumento può essere osservato nella pressione sistolica, nella pressione diastolica, o in entrambe. Per convenzione l'ipertensione è definita come una pressione sanguigna uguale o superiore a 140/90 mmHg. La pressione sanguigna può essere misurata con un qualsiasi metodo noto. Tali metodi comprendono, ma non in senso limitativo, la puntura diretta in arteria, l'oscillometria, rilevamento Doppler a ultrasuoni e lo sfigmomanometro. In una realizzazione preferita la pressione sanguigna è misurata con uno sfigmomanometro. Mentre la persona che



rileva la misura ascolta le pulsazioni del paziente e controlla lo sfigmomanometro due misure (pressione sistolica e pressione diastolica) sono registrate. La pressione sanguigna è misurata in mm di Hg.

I termini "sistolica" e "pressione sistolica" si riferiscono alla pressione indotta dalle contrazioni del cuore mediante le quali il sangue è spinto avanti e la circolazione viene mantenuta. Il termine "diastolico" e "pressione diastolica" si riferisce alla pressione indotta dalla dilatazione delle cavità del cuore durante la quale esse si riempiono di sangue. In particolare la pressione del cuore è espressa con due numeri separati da un trattino, dove il primo numero è la pressione sistolica e il secondo numero è la pressione diastolica. Come detto sopra la pressione sanguigna è misurata in mm di Hg.

Il termine "attività anti-ipertensiva" si riferisce all'effetto di un agente attivo nel ridurre la pressione sanguigna in un paziente iperteso. In una forma di realizzazione, la pressione sanguigna viene diminuita di almeno 20 mm di Hg per la pressione sistolica o di almeno 10 mm di Hg per la pressione diastolica. In un'altra forma di realizzazione, l'attività anti-ipertensiva si riferisce all'effetto di un agente attivo di abbassare la pressione sanguigna di almeno 20 mm di Hg per la pressione sistolica e di almeno 10 mm di Hg per la pressione diastolica. L'agente attivo può o no diminuire la pressione sanguigna in una persona che non ha ipertensione o può non diminuire la pressione in tutte le persone con ipertensione. In una realizzazione preferita l'agente attivo diminuisce la pressione sanguigna del paziente al di sotto di 140 - 90 mm di Hg.

Il termine "agente attivo" o "ingrediente attivo" si riferisce a un composto



che provoca un effetto farmacologico che porta a mutamento fisiologico. Nel senso qui usato agenti attivi sono agenti anti-ipertensivi, quale la lercanidipina e il lisinopril, che sono impiegati nel trattamento in combinazione dell'invenzione. Convenzionalmente un agente attivo è considerato avere un effetto anti-ipertensivo se diminuisce sia la pressione sistolica che quella diastolica del sangue di almeno 10 mm di Hg.

Il termine "diminuzione prestabilita" si riferisce alla riduzione minima della pressione sanguigna che è necessaria per un paziente per diminuire la pressione fino a/o al di sotto di 140 - 90 mm di Hg.

Pertanto un agente attivo che a un dosaggio tollerato dal paziente ottiene una riduzione di un valore prestabilito è considerato efficace per il trattamento dell'ipertensione per quel particolare paziente, e il paziente è considerato rispondente a questo agente (anche considerato "positivo"). In altre parole se un agente attivo diminuisce la pressione di un valore predeterminato in un certo tipo di paziente (cioè ha sufficiente attività anti-ipertensiva nel paziente) ma non diminuisce la pressione del predeterminato valore in un altro paziente (e cioè non ha una sufficiente attività anti-ipertensiva in quel paziente) allora il primo paziente risponde al trattamento (un "positivo" come definito qui di seguito) ma il secondo paziente non risponde (un "non positivo" come definito di seguito). La diminuzione della pressione sanguigna può essere sistolica o diastolica o entrambe.

Come usato qui il termine "positivo" si riferisce a un paziente che ha in precedenza risposto a trattamento per l'ipertensione comprendente la



somministrazione di un particolare agente attivo (o combinazione di agenti attivi) in quantitativi specifici. In altre parole, l'agente attivo o gli agenti attivi hanno l'attività anti-ipertensiva e riducono la pressione sanguigna del paziente di un valore prestabilito. Una determinazione della risposta a una terapia anti-ipertensiva può richiedere la somministrazione di una quantità particolare di un particolare agente e con determinata frequenza per un periodo di tempo di solito di un mese per gli inibitori ACE e calcio antagonisti.

Tali trattamenti comprendono la somministrazione di inibitori ACE, bloccanti dei canali calcio, beta-bloccanti e diuretici. La frase "rispondente alla monoterapia" si riferisce a pazienti ai quali una specifica attività antiipertensiva è definita come una diminuzione di almeno di 20 mm Hg nella pressione diastolica o di almeno 10 mm nella pressione diastolica.

Il termine "non positivo" si riferisce ad un paziente che è stato accertato non rispondente ad un trattamento per l'ipertensione con un particolare agente o combinazioni di agenti, e cioè per coloro nei quali il trattamento non ha raggiunto la riduzione della pressione. In altre parole l'agente o gli agenti attivi non hanno attività anti-ipertensiva nel paziente e di conseguenza la pressione sanguigna non è diminuita del valore prestabilito. Il termine include pazienti nei quali non si verifica alcuna diminuzione della pressione a seguito del trattamento ad esempio con lercanidipina da sola o lisinopril da solo.

L'espressione "risponde parzialmente" si riferisce ad un paziente per il quale un particolare agente attivo (o combinazione di agenti attivi), in



una particolare quantità, produce "attività anti-ipertensiva" nel paziente ma non diminuisce la pressione sanguigna di un "valore prestabilito". L'incremento della quantità di agente attivo (o combinazione di agenti attivi) può o meno diminuire ulteriormente la pressione sanguigna di questi pazienti. Il termine comprende pazienti che rispondono solo in modo insufficiente, e cioè mostrano una certa diminuzione della pressione sanguigna, ma meno "del valore prestabilito" (al di sotto di 140/90 mm Hg). Generalmente in questi pazienti la dose dell'agente antiipertensivo deve essere aumentata. Questo però può aggravare gli effetti collaterali.

I termini di quantitativo "sotto-ottimale" o "subliminale" di agente attivo per la monoterapia si riferiscono a quantitativi di agente attivo che sono insufficienti a diminuire la pressione sanguigna di un valore prestabilito. I quantitativi "subliminali" o "sotto-ottimale" possono variare da paziente a paziente. Un paziente per il quale è mancata la diminuzione della pressione per il valore prestabilito a seguito della somministrazione di un dato dosaggio di agente attivo può aver ricevuto un quantitativo di agente attivo o "sotto-ottimale" oppure "subliminale" oppure può essere non-rispondente a questo agente attivo. Il caso di quantità di agente attivo "sotto-ottimale" oppure "subliminale" può essere distinto dal caso della somministrazione a paziente non rispondente aumentando il dosaggio di agente attivo. Nel caso in cui il paziente non mostra una diminuzione della pressione del valore prestabilito, a seguito di un dosaggio di agente attivo "sotto-ottimale" oppure "subliminare" la somministrazione di un dosaggio maggiore consentirà al paziente la



diminuzione della pressione del valore prestabilito. Nel caso in cui il paziente non ha raggiunto la diminuzione della pressione per il valore prestabilito a seguito del fatto che detto paziente è non-rispondente, l'aumento del dosaggio del agente attivo non consentirà al paziente la prestabilita diminuzione della pressione sanguigna.

Come usato qui nel seguito il termine "mono-terapia" si riferisce alla somministrazione di un solo agente attivo per il trattamento dell'ipertensione.

Il termine "efficacia del trattamento" si riferisce alla potenzialità di un farmaco per trattamento dell'ipertensione.

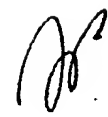
Il termine "in combinazione" si riferisce alla somministrazione concomitante di due o più agenti attivi per il trattamento di un singolo stato morboso. Nel senso qui usato di agenti attivi possono essere combinati e somministrati in un'unica forma di dosaggio, oppure possono essere somministrati in forme di dosaggio separate nello stesso tempo, oppure in forme separate somministrate in modo alternato o sequenziali nello stesso giorno o nei giorni separati. In una realizzazione preferita della presente invenzione, gli agenti attivi sono combinati tra loro e somministrati in una forma unica di dosaggio. In un'altra realizzazione preferita, gli agenti attivi sono somministrati in forme di dosaggio separate (ad es. quando è desiderabile variare il quantitativo di uno ma non dell'altro). La forma singola di dosaggio può comprendere altri ulteriori agenti attivi per il trattamento di stati morbosi. In una realizzazione preferita la formula unica di dosaggio comprende lercanidipina e lisinopril.



Il termine "terapia di combinazione " si riferisce alla somministrazione di almeno due ingredienti attivi "in combinazione" per il trattamento dell'ipertensione.

Nella presente invenzione la lercanidipina e il lisinopril possono inoltre essere combinati con uno o più ingredienti attivi ad es. un diuretico e/o un recettore beta bloccante oppure un antagonista del recettore dell'angiotensina II, senza limitazione.

Nella presente invenzione il quantitativo di lisinopril somministrato ad un paziente nella terapia di combinazione sarà preferibilmente nell'intervallo tra 2,5 e 40 mg al giorno in una singola dose o suddiviso in due dosi. Il lisinopril è messo in commercio in unità posologiche di 2,5 e di 5 mg quale dosaggio iniziale per pazienti in dialisi o che hanno altri problemi renali. Per tali pazienti si comincia con questi bassi dosaggi di lisinopril prima di aumentare la dose fino a un quantitativo efficace. Di conseguenza i dosaggi di 2,5 e di 5 mg di lisinopril sono quantitativi sotto ottimali o subliminali che non sono efficaci per un controllo dell'ipertensione. Più preferibilmente la quantità di lisinopril sarà da 10 o 20 mg. al giorno. La quantità di lercanidipina sarà preferibilmente tra 5 e 40 mg. al giorno e più preferibilmente 10 -20 mg. Le combinazioni più preferite sono : (i) 2,5 mg. di lisinopril e 2,5 mg. di lercanidipina, (ii) 2,5 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercanidipina, (iii) 5 mg. di lisinopril e 2,5 mg. di lercanidipina, (iv) 5 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercanidipina (v) 10 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercanidipina, (vi) 5 mg. di lisinopril e 10mg di lercanidipina, (vii) 10 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (viii) 10 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (ix) 20 mg di lisinopril e 10 mg di



lercanidipina, e (x) 20 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina; (xi) 2,5 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (xii) 2,5 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (xiii) 5 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (xiv) 10 mg di lisinopril e 2,5 mg di lercanidipina, (xv) 20 mg di lisinopril e 2,5 mg di lercanidipina, (xvi) 20 mg di lisinopril e 5 mg di lercanidipina, ma i quantitativi possono richiedere una ottimizzazione secondo le necessità di particolari sottogruppi di pazienti in dipendenza dal fatto che essi siano rispondenti, rispondenti in maniera parziale o non rispondenti oppure non consapevoli nei riguardi della monoterapia con lercanidipina e/o con lisinopril a dosi tollerate (Nel caso dei pazienti non consapevoli le dosi iniziali della combinazione possono anche essere più piccole delle dosi indicate, ad esempio 2,5 mg di lisinopril).

COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE

Gli agenti attivi della combinazione della presente invenzione possono essere formulati in una unica composizione farmaceutica oppure ciascuno può essere somministrato in una forma farmaceutica distinta. In ogni caso la composizione farmaceutica può comprendere eventuali altri additivi quali diluenti e carrier farmacologicamente accettabili, aromatizzanti, dolcificanti, conservanti, coloranti, leganti, agenti sospendenti , agenti disperdenti, disintegranti, eccipienti, lubrificanti, plastificanti, oli commestibili oppure una qualsiasi combinazione di due o più dei suddetti ingredienti.

Diluenti o carriers farmacologicamente accettabili comprendono, ma non in senso limitativo : etanolo, acqua, glicerolo, gel di aloe vera, allantoina, vitamina A, vitamina E, olio minerale, PPG2 miristilpropionato, magnesio



carbonato, potassio fosfato, olio vegetale, olio animale e solketal.

Come leganti adatti si possono citare, ma non in senso limitativo, amido, gelatina, zuccheri naturali, come glucosio, saccarosio, lattosio; dolcificanti da mais, gomme naturali o sintetiche quali acacia, adragante, gomme vegetali, sodio alginato, carbossimetilcellulosa, polietilenglicole, cere e simili.

Disintegratori idonei comprendono (ma non in senso limitativo) : amido, come l'amido di mais, metilcellulosa, agar, bentonite, gomma xantànica e simili.

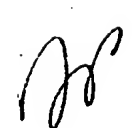
Lubrificanti adatti comprendono, ma non in senso limitativo, sodio oleato, sodio stearato, magnesio stearato, sodio benzoato, sodio acetato, sodio cloruro e simili.

Si può considerare quale agente sospendente idoneo, ma non in senso limitativo, la bentonite.

Agenti sospendenti e disperdenti adatti comprendono, ma non in senso limitativo, gomme naturali o sintetiche, quali gomme vegetali, adragante, acacia, alginato, destrano, sodio carbossimetilcellulosa, metilcellulosa, polivinilpirrolidone e gelatina.

Oli commestibili adatti comprendono, ma non in senso limitativo, olio di semi di cotone, olio di sesamo, olio di cocco e olio di arachide.

Esempi di additivi ulteriori comprendono, senza per altro costituire una limitazione, sorbitolo, talco, acido stearico, fosfato bicalcico. Si possono usare preparazioni contenenti lisinopril (con o senza altri ingredienti attivi) e lercanidipina, disponibili in commercio. Naturalmente se la preparazione contiene più di un ingrediente attivo, i quantitativi nella



combinazione devono eventualmente essere regolati a valori inferiori.

Forme farmaceutiche a dosaggio unitario.

La composizione farmaceutica può essere formulata come forma a dosaggio unitario, quale compresse, pillole, capsule, boli, polveri, granuli, soluzioni sterili per uso parenterale, sospensioni sterili per uso parenterale, elisir, tinture, aerosol o spray liquidi in quantità dosata, gocce, fiale, dispositivi per autoiniezioni, supposte. Le forme di dosaggio unitario possono essere usate per somministrazione orale, parenterale, intranasale, sublinguale, o rettale, o per somministrazione mediante inalazione o insufflazione, o cerotti transdermici e composizioni liofilizzate. In generale può essere usato qualsiasi sistema di somministrazione di ingredienti attivi che dia luogo a una disponibilità sistemica degli stessi. Preferibilmente la forma di dosaggio unitario è una forma farmaceutica orale di dosaggio e ancor più preferibilmente una forma solida orale di dosaggio e pertanto le forme preferite di dosaggio sono compresse, pillole, capsule. Tuttavia anche le composizioni per uso parenterale sono tra le preferite. Le forme farmaceutiche solide di dosaggio possono essere preparate miscelando gli agenti attivi della presente invenzione con un carrier farmacologicamente accettabile e con un qualsiasi altro ingrediente desiderato. La miscela è tipicamente miscelata fino quando si ottiene una miscela omogenea degli agenti attivi della presente invenzione con il carrier e con un qualsiasi altro ingrediente desiderato e cioè fino a quando gli agenti attivi sono dispersi in modo uniforme nella composizione. In questo caso la composizione può essere in forma di granulato secco o umido.



Compresse e pillole possono essere rivestite o diversamente formulate per formare una forma di dosaggio unitario che può avere un'azione di rilascio ritardata e/o prolungata come le forme a dosaggio unitario con tempo di rilascio ritardato e controllato. Ad esempio le compresse o le pillole possono comprendere un componente a dosaggio interno e uno a dosaggio esterno, il secondo essendo in forma di uno strato o rivestimento al di sopra del primo. I due componenti possono essere separati da uno strato enterico che serve per resistere alla disintegrazione nello stomaco e permettere al componente interno di passare intatto nel duodeno o di essere procrastinato nel rilascio.

I polimeri biodegradabili per controllare il rilascio degli agenti attivi includono, ma non in senso limitativo, acido polilattico, poliepsilon caprolattone, acido poliidrossibutirrico, poliortoesteri, poliacetali, polididropirani, policianoacrilati e copolimeri a blocchi reticolati o anfipatici di idrogeli.

Per le forme di dosaggio liquide, le sostanze attive o i loro sali fisiologicamente accettabili sono portate in soluzione o sospensione o emulsione, eventualmente con le sostanze impiegate di solito, come solubilizzanti, emulsionanti e altri agenti ausiliari. I solventi per le combinazioni di principi attivi e i loro sali corrispondenti fisiologicamente accettabili possono comprendere l'acqua, soluzioni fisiologiche saline o alcoli quali l'etanolo, il propandiololo o il glicerolo. Inoltre si possono utilizzare soluzioni di zucchero come ad esempio soluzioni di glucosio o di mannitolo. Si può inoltre usare una miscela dei vari solventi sopra citati nella presente invenzione.



Una forma di dosaggio transdermico è pure considerata nella presente invenzione. Le forme transdermiche possono essere controllate da un sistema transdermico basato sulla diffusione (cerotto transdermico) per mezzo sia di un sistema a reservoir liquido oppure mediante un sistema in cui il principio attivo risulta disperso in una matrice adesiva. Altre forme di dosaggio transdermico, comprendono, ma non in senso limitativo, gel topici, lozioni, unguenti, sistemi transmucosali e loro dispositivi, sistemi di rilascio iontoforetici (diffusione elettrica del principio attivo). Il dosaggio transdermico può essere usato per il rilascio programmato e ritardato degli agenti attivi della presente invenzione.

Le composizioni farmaceutiche e le forme di unità di dosaggio della presente invenzione per la somministrazione parenterale, in particolare mediante iniezione, comprendono tipicamente un carrier farmacologicamente accettabile, del tipo sopra descritto. Un carrier liquido preferito è l'olio vegetale. Le iniezioni possono essere ad esempio endovena, epidurali, intratecali, intramuscolari, intraruminali, intratracheali o sottocutanee.

Gli agenti attivi possono essere somministrati anche sotto forma di liposomi, in forma di piccole vescicole unilamellari o di vescicole unilamellari di maggiori dimensioni o di vescicole multilamellari.

I liposomi possono essere formati da una varietà di fosfolipidi, come colesterolo, fosfatidilcolina o stearilamina.

Gli agenti attivi della presente invenzione possono anche essere accoppiati con polimeri solubili quali carriers o veicoli mirati del farmaco.

Questi polimeri comprendono, ma non in senso limitativo, polivinil-



pirrolidone, copolimeri del pirano, poliidrossipropilmetacrilammido-fenolo, poliidrossi-etilaspartamide-fenol, e polietilenossido-polilisina sostituita con radicali palmitoil.

La lercanidipina può essere formulata quale sale fisiologicamente accettabile come es. un sale di acido inorganico od organico ad es. HCl, HBr, H_2SO_4 , acido maleico, fumarico tartarico e citrico.

ESEMPI DI COMPOSIZIONE

TABELLA 1: Formulazione I

Ingredienti	Quantità (mg/compressa)
Lercanidipina HCl	10
Lisinopril (come forma diidrata)	10
Lattosio	102
Cellulosa microcristallina	40
Sodio bicarbonato	8
Amidoglicolato di sodio	20
Povidone K30	8
Stearato di magnesio	2

Una compressa con film di rivestimento può essere preparata usando i nuclei sopra descritti e la composizione descritta nella tabella 2.

TABELLA 2: Rivestimento per compresse di formula indicata in tabella 1.

Ingredienti	Quantità
Hypromellose	1,91 mg.
talco	0,15 mg.
biossido di titanio	0,60 mg.
Macrogol 6000	0,30 mg.
ossido ferrico	0,04 mg.

TABELLA 3:formulazione II.

Ingredienti	mg/compressa	mg/compressa
Iercanidipina HCl	5,0 mg	10 mg
lattosio mono idrato	35,0 mg	30,0 mg
cellulosa microcristallina	39,0 mg	39,0 mg
amido glicolato di sodio	15,5 mg	15,5 mg
Povidone	4,5 mg	4,5 mg
magnesio stearato	1,0 mg	1,0 mg
<u>Rivestimento</u>		
Opadry OY-SR-6497		
Hypromellose	1,91 mg	1,91 mg
Talco	0,15 mg	0,15 mg
biossido di titanio	0,60 mg	0,60 mg
Macrogol 6000	0,30 mg	0,30 mg
Ossido di ferrico	0,04 mg	0,04 mg
TOTALE:	103 mg	103 mg

SOMMINISTRAZIONE

La composizione farmaceutica o le forme a dosaggio unitario della presente invenzione possono essere somministrate in vari modi come ad esempio per via indovena, intratracheale, sotto cutanea orale parenterale, boccale, sublinguale, oftalmica, polmonare, transmucosale, transdermica, e intramuscolare. Forme farmaceutiche a dosaggio unitario possono essere somministrate anche per via intranasale con l'applicazione topica di adatti veicoli intranasali, oppure per via transdermica usando quelle forme farmaceutiche transdermali note quali cerotti transdermici o dermici noti agli esperti del ramo. La somministrazione orale è la più preferita.

La composizione farmaceutica o le forme farmaceutiche di dosaggio unitario della presente invenzione possono essere somministrate ad animali, preferibilmente ad esseri umani che necessitano di un trattamento antiipertensivo. La composizione farmaceutica o la forma farmaceutica di dosaggio unitario della presente invenzione possono

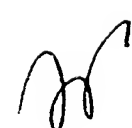


essere somministrate secondo un regime di dosaggio e di somministrazione definito sulla base di test di routine alla luce delle direttive date sopra allo scopo di ottenere l'attività antiipertensiva ottimale (specialmente per pazienti che sono rispondenti parziali o per quelli che sono non rispondenti alla monoterapia convenzionale o ad altre combinazioni terapeutiche) e una diminuzione prestabilita della pressione sanguigna rendendo minima contemporaneamente la tossicità e gli effetti collaterali per un particolare tipo di paziente.

Tuttavia una ottimizzazione del trattamento terapeutico diventa una procedura di routine alla luce delle direttive qui fornite.

Il dosaggio degli agenti attivi della presente invenzione può variare a seconda della varietà dei fattori quali lo stato patologico di fondo, le condizioni individuali, il peso, il sesso e l'età del paziente e le modalità della somministrazione. Per la somministrazione orale le composizioni farmaceutiche possono essere fornite in forma solida, di dosaggio unitario, sia con linea di frattura predisposta sia senza. Per il lisinopril le forme di dosaggio comprendono 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 o 40,0 mg per l'aggiustamento sintomatico del dosaggio in relazione al paziente da trattare. Preferibilmente le forme di dosaggio del lisinopril comprendono 2,5 , 5,0 , 10,0 o 20,0 mg. Per la lercandipina le forme di dosaggio comprendono 2,5 , 5,0 , 10,0, 20,0 o 40,0 mg per l'aggiustamento sintomatico del dosaggio in base al paziente da trattare. Preferibilmente le forme di dosaggio della lercanidipina comprendono 2,5 , 5,0 , 10,0 o 20,0 mg.

Per la combinazione terapeutica secondo l'invenzione gli agenti attivi



possono essere inizialmente forniti come forme di dosaggio separate fino a quando si raggiunge una combinazione ottimale di dosaggio. Dopo che si è accertato il dosaggio appropriato per conseguire la diminuzione voluta della pressione, si può passare alla terapia basata sulla somministrazione di una singola forma di dosaggio contenente quantità appropriate di ogni agente attivo, oppure si può continuare la somministrazione delle due forme singole di dosaggio. Preferibilmente la forma a dosaggio singolo comprende un primo quantitativo di lisinopril da 2,5 a 40 mg/giorno. Preferibilmente la forma a dosaggio singolo comprende un secondo quantitativo di lercanidipina da circa 5 a circa 40 mg/giorno. In una realizzazione preferita la forma a dosaggio singolo comprende da 5 a 20 mg di lisinopril e da 10 a 20 mg di lercanidipina. In una realizzazione ancora più preferita il quantitativo di lisinopril sarà da 10 a 20 mg/giorno. Il quantitativo di lercanidipina sarà preferibilmente da 5 a 40 mg e ancor più preferibilmente da 10 a 20mg/giorno. Le combinazioni preferite sono: (i) 2.5 mg di lisinopril e 2.5 mg di lercanidipina, (ii) 2.5 mg di lisinopril e 5 mg di lercanidipina, (iii) 5 mg di lisinopril e 2.5 mg di lercanidipina, (iv) 5 mg di lisinopril e 5mg di lercanidipina, (v) 10 mg di lisinopril, 5 mg di lercanidipina, (vi) 5 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (vii) 10 mg di lisinopril 10 mg di lercanidipina, (viii) 10 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (ix) 20 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (x) 20 mg di lisinopril e 20 mg di lercandipina, (xi) 2.5 mg di lisinopril e 10 mg di lercandipina, (xii) 2.5 mg di lisinopril e 20 mg di lercandipina, (xiii) 5 mg di lisinopril e 20 mg di lercandipina, (xiv) 10 mg di lisinopril e 2.5 mg di lercandipina, (xv) 20mg.



di lisinopril e 2,5 mg. di lercandipina, (xvi) 20 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercandipina.

Una composizione farmaceutica per somministrazione parenterale contiene da ca. 0,01% a ca. 100% in peso degli agenti attivi della presente invenzione, rispetto a 100% in peso e della composizione farmaceutica totale.

Generalmente le forme farmaceutiche per il dosaggio transdermico contengono da 0,01% a ca. 100% in peso degli agenti attivi rispetto a 100% totale in peso del dosaggio.

Il dosaggio esatto e la modalità di somministrazione utilizzando la combinazione terapeutica della presente invenzione sono scelti d'accordo con una molteplicità di fattori comprendenti il tipo, la specie, l'età, il peso, il sesso e la condizione patologica del paziente; la serietà e la eziologia della ipertensione da trattare, la modalità di somministrazione, la funzionalità renale ed epatica del paziente; la storia del trattamento del paziente; e la rispondenza del paziente.

Una precisione ottimale nel raggiungere le concentrazioni di agenti attivi nell'ambito che consente efficacia senza problemi di tossicità, richiede una modalità di somministrazione basata sul cinetica della disponibilità del farmaco nelle zone interessate. Questo comporta una considerazione dell'assorbimento, distribuzione, metabolismo, ed eliminazione di un farmaco, e il grado di risposta del paziente alla modalità del dosaggio. Tuttavia una tale regolazione fine della modalità terapeutica diventa un compito di routine alla luce delle direttive qui fornite.



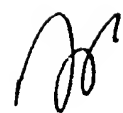
La composizione farmaceutica nella forma di dosaggio unitario può essere somministrata in una singola dose giornaliera oppure il dosaggio totale giornaliero può essere somministrato in più dosi.

Inoltre la somministrazione concomitante o sequenziale di alti agenti attivi può essere desiderabile.

Per es. è prevista dalla presente invenzione l'aggiunta alla combinazione di lercanidipina e di lisinopril, di un diuretico, di un recettore beta-bloccante o di un antagonista del recettore dell'angiotensina II.

Le quantità di dosaggio degli agenti attivi possono essere regolate quando sono combinati con altri agenti attivi per ottenere gli effetti desiderati (ad es. riduzione della pressione sanguigna per un determinato valore, riduzione o assenza di un particolare effetto collaterale).

Per il trattamento con la combinazione di lercanidipina e lisinopril quando gli agenti attivi sono in formulazioni separate di dosaggio, gli agenti attivi possono essere somministrati contemporaneamente oppure possono essere somministrati separatamente in tempi diversi. Ad es. il lisinopril può essere somministrato al mattino e lercanidipina alla sera o viceversa. Agenti attivi addizionali possono pure essere somministrati ad intervalli di tempo definiti. L'ordine della somministrazione dipenderà dal complesso di fattori comprendenti età, il peso, il sesso, e la condizione patologica del paziente; la gravità l'eziologia della ipertensione da trattare, la modalità di somministrazione, la funzionalità renale ed epatica del paziente; e la storia del trattamento terapeutico del paziente e della



sua risposta al farmaco.

La determinazione dell'ordine di somministrazione può essere regolata in modo preciso in quanto tale regolazione è un compito routinario alla luce delle direttive qui date.

In una realizzazione preferita della presente invenzione, la composizione è somministrata giornalmente al paziente. In una ulteriore realizzazione la composizione di lercanidipina e lisinopril è formulata in una forma singola di dosaggio.

I pazienti ai quali si può somministrare la composizione qui descritta, includono, senza limitazioni, i rispondenti parzialmente o i non rispondenti alla monoterapia con lercanidipina o con lisinopril o con un'altro calcio antagonista o ACE inibitore, e parzialmente rispondenti o non rispondenti ad altre terapie di combinazione. Un'altra classe di pazienti comprende i rispondenti alla monoterapia che soffrono di effetti collaterali in dipendenza del dosaggio e i rispondenti alla monoterapia i quali sono stati previamente accertati (o che si presume che lo diventino) parzialmente rispondenti o non rispondenti con l'andar del tempo. La classifica dei pazienti in non rispondenti, parzialmente rispondenti, e rispondenti a trattamento anti-ipertensivo particolare è eseguita in modo convenzionale attraverso sperimentazione e tentativi.

Recentemente metodi farmacogenomici che implicano aplo-tipizzazione sono stati utilizzati per identificare i pazienti rispondenti, vedi ad es. brevetti USA n°6.200.754.;6.183.958;6.110.684: WO -98/45477.

USI E METODI PER IL TRATTAMENTO DELL'IPERTENSIONE

La presente invenzione riguarda un metodo per il trattamento

dell'ipertensione mediante somministrazione al paziente di una combinazione di lercanidipina e lisinopril. In una realizzazione preferita la combinazione dei due agenti attivi è formulata in una unica composizione farmaceutica.

Al paziente viene somministrato la combinazione a intervalli prescritti (di solito una volta al dì) per mantenere un quantitativo fisiologicamente efficace degli agenti attivi nel sistema del paziente per produrre l'effetto desiderato (e cioè la riduzione della pressione sanguigna del paziente di un predeterminato valore). La composizione può essere somministrata per una qualsiasi via, come descritto sopra ma la somministrazione orale è quella preferita per un trattamento cronico.

Il metodo può essere usato per il trattamento dell'ipertensione in pazienti rispondenti, parzialmente rispondenti e non rispondenti alla mono-terapia.

ESEMPI

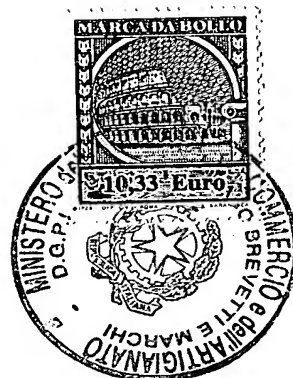
La presente invenzione sarà meglio compresa con riferimenti ai seguenti esempi, i quali sono forniti a puro titolo illustrativo dell'invenzione, e quindi non sono da considerarsi in senso limitativo.

ESEMPIO I: MODELLO DI IPERTENSIONE ACUTA DA ANGIOTENSINA.

IPERTENSIONE RENALE IN RATTI ANESTETIZZATI.

METODI.

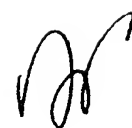
Ratti maschi Sprague-Dawley, del peso di 250-300 gr, sono anestetizzati con pentobarbital sodico (35mg./Kg.i.p.) e posti su una coperta termica. La temperatura è mantenuta a 37°C con un



termoregolatore mediante una sonda rettale. Gli animali vengono tracheotomizzati per facilitare il respiro spontaneo. Un catetere di polietilene è disposto nella vena giugulare sinistra per consentire l'infusione del pentobarbital sodico e quindi mantenere l'anestesia. La vena femorale e l'arteria sinistra vengono intubate con cateteri di polietilene per consentire la somministrazione del farmaco e monitorare la pressione sanguigna.

Gli animali sono sottoposti a nefrectomia sinistra mediante asportazione del rene sinistro mediante un'incisione sul fianco. Il rene destro e la vena renale, l'arteria e l'uretere vengono quindi evidenziati mediante incisione retroperitoneale destra, sotto un microscopio di sezionamento. Fili di seta sono disposti attorno alla vescica e all'uretere. La cavità è poi coperta con olio di vaselina. Vedi Recordati et al. 2000, J. Hypertension, 18: 1277- 1287.

Dopo 30-60 minuti di registrazione basale della pressione arteriosa sanguigna e del battito cardiaco i fili attorno ai vasi renali e all'uretere sono tagliati vicino all'ilo renale per indurre una ischemia renale completa del rene destro. Dopo due ore di ischemia indicata con "120" nelle tabelle 4-7, i fili sono rimossi per consentire la riperfusione renale e l'emissione di urina. La riapertura dell'ilo-renale e il ripristino della circolazione renale, inducono un aumento della pressione sanguigna che raggiunge un massimo in 5 minuti e dura circa 60 minuti. I farmaci (placebo, lisinopril 30 µg/Kg.), lercanidipina (10 µg/Kg.) o entrambi lercanidipina (10 µg/Kg.) e lisinopril (30 µg/ kg.) sono somministrati per via endovenosa 5 min. dopo che la riperfusione è incominciata (indicata



con "125" in tabella 4-7).

L'analisi statistica è effettuata durante il periodo di ri-perfusione (da 125 a 180 min.). Per valutare le differenze statistiche tra i gruppi sottoposti al trattamento i dati sono analizzati usando un dispositivo ANOVA a tre vie (analisi della varianza) con ripetute misure sul fattore tempo e comparse multiple pre-pianificate. L'analisi statistica è effettuata per mezzo di procedura di modello generale lineare (GLM) con SAS software versione 6.12.

RISULTATI

La somministrazione sia del lisinopril che della lercanidipina da soli porta ad una diminuzione significativa della pressione sistolica, diastolica e della pressione arteriosa media, a confronto con il solo veicolo (placebo).

Il trattamento di combinazione con lisinopril e lercanidipina porta a una significativa diminuzione della pressione sistolica, e/o diastolica e/o la pressione arteriosa media, a confronto con il veicolo da solo e/o la somministrazione di lisinopril e lercanidipina da soli come risulta dalle tabelle 4-7 riportate e dalle figure 1-2 allegate alla presente domanda.



TABELLA 4: Andamento nel tempo degli effetti sulla pressione sanguigna sistolica, diastolica e frequenza cardiaca dopo somministrazione endovenosa di **placebo** (0,5 ml/kg) su ratti uninefrectomizzati anestetizzati. Valori \pm deviazione standard (n=8)

Tempo (Min)	SBP* (mmHg)		DBP** (mmHg)		HR*** (Battiti/min)
0	108,1 \pm 3,1		66,0 \pm 2,0		357,5 \pm 14,5
Ischemia					
120	111,5 \pm 3,6		65,9 \pm 2,8		358,1 \pm 10,3
Riperfusione					
125	166,0 \pm 9,4		119,8 \pm 4,3		370,4 \pm 5,7
Farmaco					
130	159,6 \pm 8,1		115,8 \pm 4,6		380,6 \pm 6,6
135	152,0 \pm 7,6		112,9 \pm 5,4		387,3 \pm 9,3
150	144,1 \pm 7,6		106,1 \pm 6,2		389,0 \pm 9,4
165	131,9 \pm 6,9		94,7 \pm 7,0		396,9 \pm 9,6
180	121,9 \pm 7,6		84,8 \pm 7,6		396,9 \pm 9,4

*: pressione sistolica; ** : pressione diastolica; ***: frequenza cardiaca

TABELLA 5: Andamento nel tempo degli effetti sulla pressione sanguigna sistolica, diastolica e frequenza cardiaca dopo somministrazione endovenosa di **lisinopril** (30µg/kg) su ratti uninefrectomizzati anestetizzati. Valori \pm deviazione standard (n=6)

Tempo Min	SBP* mmHg	DBP** mmHg	HR*** Battiti/min
0	104,2 \pm 3,0	73,3 \pm 3,2	393,3 \pm 8,8
<u>Ischemia</u> 120	99,3 \pm 2,4	68,3 \pm 2,3	390,3 \pm 10,0
<u>Riperfusione</u> 125	154,3 \pm 3,6	117,3 \pm 1,3	398,3 \pm 18,8
<u>Farmaco</u>			
130	120,7 \pm 1,7 b	92,5 \pm 1,0 b	408,3 \pm 12,3
135	119,0 \pm 2,1 b	90,5 \pm 1,2 b	405,8 \pm 9,7
150	111,0 \pm 4,0 b	77,7 \pm 4,1 b	406,7 \pm 13,1
165	96,0 \pm 6,0 b	64,0 \pm 4,8 b	406,7 \pm 18,2
180	90,2 \pm 6,8 b	57,3 \pm 5,1 b	400,0 \pm 14,6

*: pressione sistolica; ** : pressione diastolica; ***: frequenza cardiaca; b= $p < 0,001$ se confrontato con lo stesso tempo del placebo



[Handwritten signature]

TABELLA 6: Andamento nel tempo degli effetti sulla pressione sanguigna sistolica, diastolica e frequenza cardiaca dopo somministrazione endovenosa di **lercanidipina** (10 μ g/kg) e **lisinopril** (30 μ g/kg) su ratti uninefrectomizzati anestetizzati. Valori \pm deviazione standard (n=8)

Tempo Min	SBP* mmHg		DBP** mmHg		HR*** Battiti/min
0	110,4 \pm 3,6		69,8 \pm 2,5		359,6 \pm 13,9
Ischemia 120	114,5 \pm 6,5		70,6 \pm 5,4		359,3 \pm 7,8
Riperfusio- Ne 125	167,6 \pm 8,9		119,3 \pm 5,2		383,6 \pm 9,9
Farmaco 130	140,4 \pm 3,8 b		97,1 \pm 3,1 b		433,1 \pm 8,9
135	140,5 \pm 3,7 a		93,1 \pm 4,0 b		448,0 \pm 6,2
150	139,4 \pm 3,7		89,5 \pm 4,3 b		443,6 \pm 8,2
165	132,0 \pm 5,3		83,5 \pm 4,6		435,5 \pm 11,2
180	128,1 \pm 4,7		78,8 \pm 4,0		422,8 \pm 12,0

*: pressione sistolica; ** : pressione diastolica; ***: frequenza cardiaca; a= p<0,05; b= p<0,001 se confrontato con lo stesso tempo del placebo.

TABELLA 7: Andamento nel tempo degli effetti sulla pressione sanguigna sistolica, diastolica e frequenza cardiaca dopo somministrazione endovenosa di **lercanidipina** (10µg/kg) su ratti uninefrectomizzati anestetizzati. Valori \pm deviazione standard (n=6)

Tempo Min	SBP* MmHg		DBP** mmHg		HR*** beats/min
0	104,3 \pm 3,4		75,7 \pm 2,8		397,5 \pm 3,6
Ischemia 120	102,3 \pm 3,2		69,3 \pm 1,9		380,0 \pm 11,0
Riperfusione 125	154,8 \pm 6,9		119,7 \pm 2,8		378,3 \pm 6,5
Farmaco 130	95,0 \pm 6,6 B		67,2 \pm 7,8 b		437,5 \pm 10,5
135	90,2 \pm 5,8 B		58,5 \pm 4,8 b		438,3 \pm 9,8
150	92,3 \pm 4,9 b		59,5 \pm 3,6 b		435,0 \pm 6,2
165	84,3 \pm 4,3 b		53,5 \pm 3,9 b		430,0 \pm 8,2
180	79,8 \pm 6,1 b		50,5 \pm 4,6 b		418,3 \pm 4,8

*: pressione sistolica; ** : pressione diastolica; ***: frequenza cardiaca; b= p<0,001se confrontato con lo stesso tempo del placebo

Come si osserva dai dati sopra riportati e dai grafici di figure 1 e 2 l'effetto è sinergico e cioè superadditivo.

ASSOCIAZIONE DI LERCANIDIPINA E DI LISINOPRIL NELLA IPERTENSIONE RENALE NEI CANI

METODI.

Vengono usati cani maschi beagle di 10 - 12 mesi e del peso tra 10 e 11 kg. Tutti i cani sono stati addestrati per molte settimane per adattarli senza stress all'ambiente dove si svolge il test. E' stata indotta ipertensione cronica elevata in quattro cani mediante costrizione bilaterale dell'arteria renale secondo il metodo Goldblatt dei "due reni, due costrizioni per ipertensione". In breve sotto anestesia da

pentobarbital sodico (35 mg per kg endovena) durante due diversi interventi chirurgici a distanza di 15 giorni uno dall'altro, in condizioni sterili, entrambe le arterie renali sono pinzate con pinzette renali originali in argento e ristrette di circa 60% - 70%. Dopo due mesi dall'ultimo intervento, risulta una ipertensione renale provocata e gli animali vengono sottoposti all'impianto di catetere sensore.

Sotto anestesia da pentobarbital sodico (35 mg/kg i.v.), in condizioni sterili, i cani sono cateterizzati mediante inserimento di un catetere sensore (Mikro-Tip) nel tratto ascendente dell'aorta attraverso l'arteria femorale destra. Il catetere è evidenziato sotto cute sul dorso del collo.

Dopo una settimana di ricovero successivamente all'intervento chirurgico, gli animali sono disposti in una unità di contenimento per cani, costituita da una struttura con amaca sospesa per cane e collegati a un trasduttore di pressione per monitorare la pressione sanguigna arteriosa. Tutti gli animali sono trattati alternativamente con il veicolo (placebo), con la lercanidipina, con il lisinopril e con la combinazione di lercanidipina e lisinopril che vengono somministrati per via orale mediante sonda gastrica.

La pressione sanguigna (sistolica e diastolica) è monitorata per 6 ore dopo la somministrazione. L'analisi statistica è effettuata dal tempo 0 al tempo di 360 min. Per valutare le differenze statistiche tra i trattamenti i dati sono analizzati con l'uso di un ANOVA a tre vie, con misure ripetute sul fattore tempo e confronti multipli preprogrammati. L'analisi statistica è effettuata mediante GLM (procedura a modello lineare generale) con SAS software versione 6.12.



* * *

L'ambito della presente invenzione non è limitato agli esempi di realizzazione specifici qui descritti. In realtà molte varianti dell'invenzione in aggiunta a quelle già qui descritte saranno evidenti all'esperto del ramo dalla descrizione già fornita e dalle figure allegate. Tali modifiche sono intese comprese nell'ambito delle rivendicazioni allegate.

Inoltre si deve intendere che i valori forniti sono approssimati e sono forniti a titolo illustrativo della descrizione.

I brevetti, le domande di brevetto, le pubblicazioni, gli atti di procedura e simili sono incorporati in questa domanda di brevetto nella loro totalità, come riferimento.

*Handwritten signature or initials.*

RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica comprendente una combinazione di:
a) lercanidipina; b) lisinopril idonea per il trattamento dell'ipertensione.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui il rapporto in peso tra lercanidipina e lisinopril è compreso tra 1:1 e 1: 2.
3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, sotto forma di formulazione suddivisa o suddivisibile in forme di dosaggio contenenti da 5 a 40 mg di lisinopril da 5 a 40 mg di lercanidipina.
4. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, sotto forma di formulazione suddivisa o suddivisibile in forme di dosaggio contenenti da 2,5 mg a 20 mg di lercanidipina e da 2,5 a 20 mg di lisinopril.
5. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4 in cui il dosaggio della lercanidipina è compreso tra 10 e 20 mg.
6. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4 in cui il dosaggio del lisinopril è compreso tra 5 e 20 mg.
7. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 , sotto forma di formulazione suddivisa o suddivisibile in forme farmaceutiche di dosaggio, scelta nel gruppo costituito dalle seguenti coppie di principi attivi :

(i) 2,5 mg. di lisinopril e 2,5 mg. di lercanidipina, e (ii) 2,5 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercanidipina, (iii) 5 mg. di lisinopril e 2,5 mg. di lercanidipina, (iv) 5 mg. di lisinopril e 5 mg. di lercanidipina (v) 10 mg. lisinopril e 5 mg. di lercanidipina, (vi) 5 mg. di lisinopril e 10mg di lercanidipina, (vii) 10 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (viii) 10 mg di lisinopril e 20 mg



di lercanidipina, (ix) 20 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, e (x) 20 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina; (xi) 2,5 mg di lisinopril e 10 mg di lercanidipina, (xii) 2,5 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (xiii) 5 mg di lisinopril e 20 mg di lercanidipina, (xiv) 10 mg di lisinopril e 2,5 mg di lercanidipina, (xv) 20 mg di lisinopril e 2,5 mg di lercanidipina, (xvi) 20 mg di lisinopril e 5 mg di lercanidipina,

8. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 , nella quale la combinazione di lercanidipina con lisinopril viene preparata estemporaneamente al momento dell'impiego a partire da detti componenti.

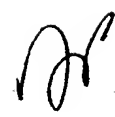
9. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, per il trattamento di pazienti ipertensivi rispondenti alla monoterapia sia con lisinopril che con lercanidipina, ma che soffrono degli effetti collaterali causati da detti principi attivi.

10. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, per il trattamento di pazienti non rispondenti alla monoterapia con antiipertensivi.

11. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, per il trattamento di pazienti parzialmente rispondenti alla monoterapia o alla terapia di combinazione con antiipertensivi.

12. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8 per il trattamento di pazienti rispondenti alla monoterapia , ma per i quali è stato accertato in precedenza o si presume che diventino col tempo non rispondenti.

(ASE/lm)



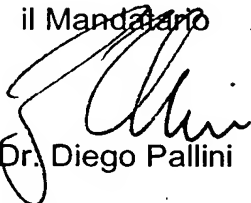
3848PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A.

Milano, li 3 Dicembre 2002

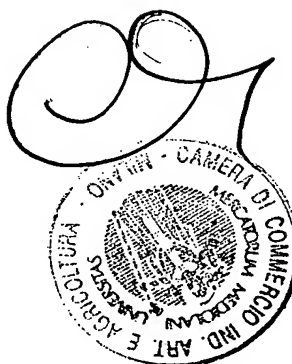
p. RECORDATI INDUSTRIA CHIMICA E FARMACEUTICA S.p.A.

il Mandatario



Dr. Diego Pallini

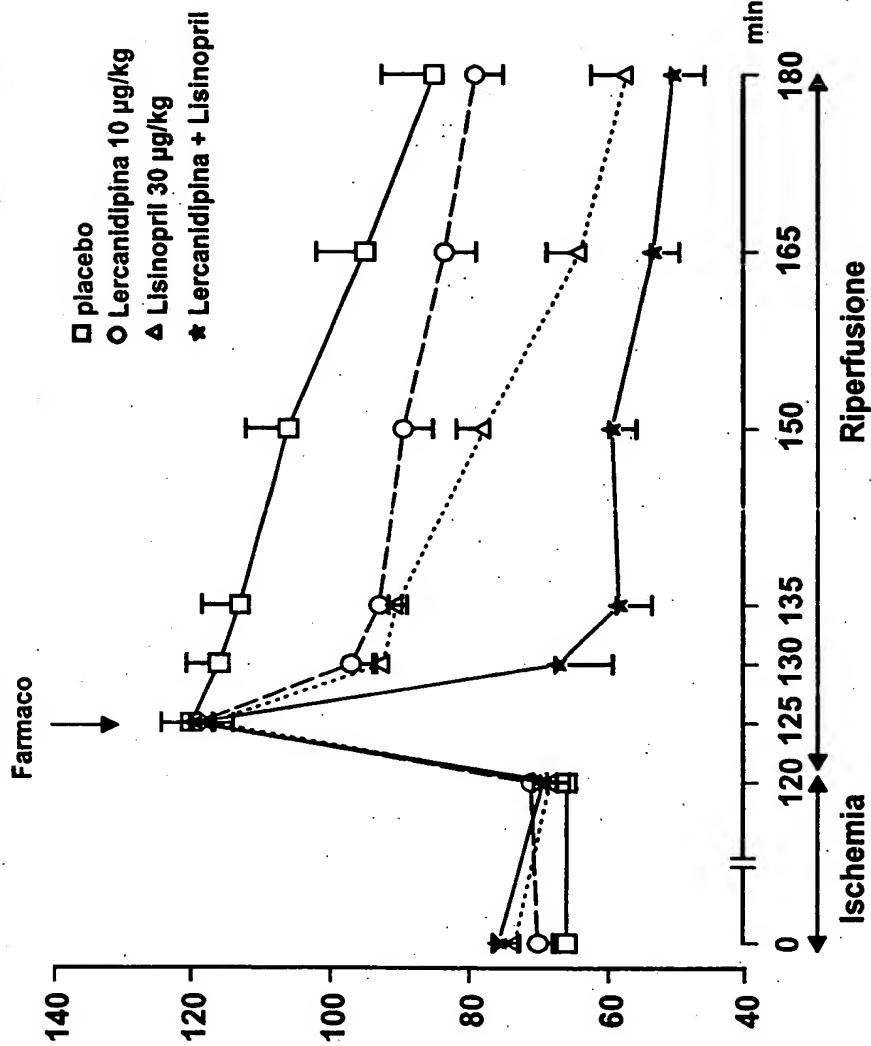
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



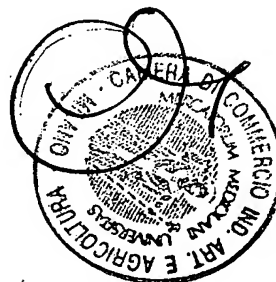
[Handwritten signature]

FIG.1

Effetti della ischemia renale nei ratti uninefrectomizzati ed anestetizzati



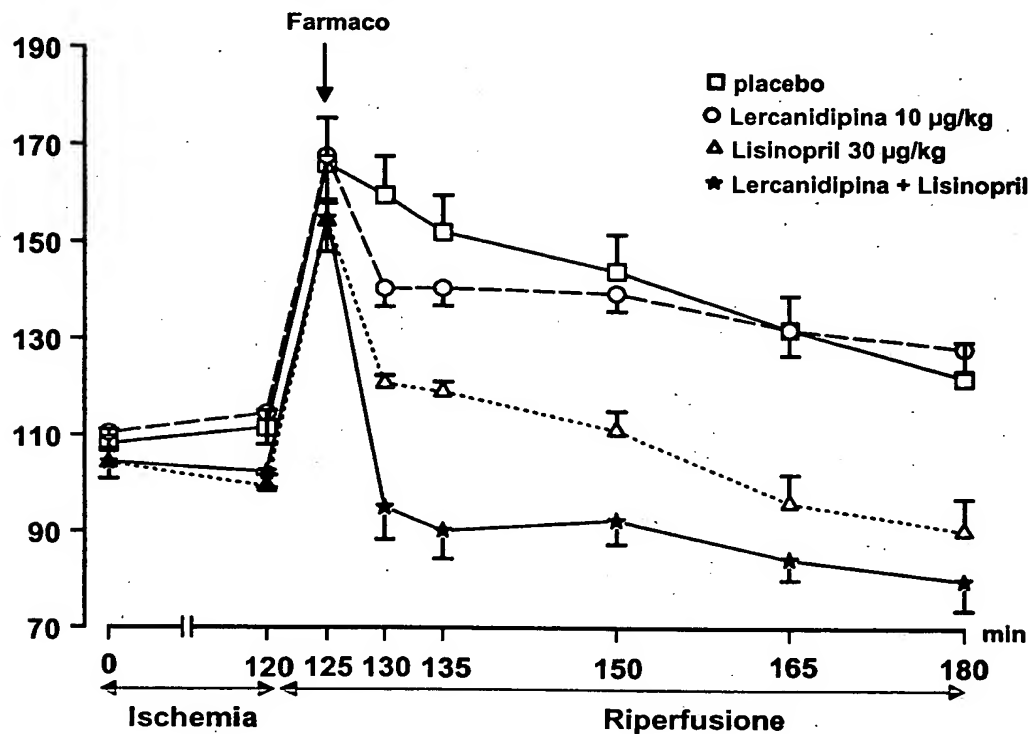
MI 2002A 0 02594



[Handwritten signature]

FIG.2

Effetti della ischemia renale in ratti uninefrectomizzati ed anestetizzati



MI 2002A 002594

